

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253056

研究課題名(和文)肥満と肝臓疾患：NASHの病態解明を目指して

研究課題名(英文)Obesity and liver diseases: towards clarification of mechanisms for NASH

研究代表者

宮崎 徹(Miyazaki, Toru)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30396270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,000,000円

研究成果の概要(和文)：NASHは、脂肪肝から肝硬変、肝癌に進行する病態を示す。AIMはマクロファージが産生する血中タンパク質であるが、我々は、高脂肪食負荷による脂肪肝形成を経て、AIM欠損マウスにのみ顕著な肝癌が形成されることを確認し、AIMのNASH肝癌抑制機能を見出した。AIMは脂肪細胞と同様に肝細胞に取り込まれ、中性脂肪の蓄積を抑えることから脂肪肝の亢進を抑えるが、その後の炎症や線維化の程度には影響しないことから、AIMの作用は細胞の癌化の抑制ではなく、癌化した細胞を除去であることを示した。すなわち、AIMは癌細胞特異的に細胞表面に蓄積することで補体系の活性化を促し、癌細胞に細胞死を誘導する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：NASH is a liver disease involved with a steatosis, which can be a cause of a cirrhosis, thereby is sometimes followed by HCC. In this study, we found that HCC was significantly developed in AIM-deficient mice fed a high fat diet for 1 year whereas wild-type mice did not show any HCC development, demonstrating that AIM possesses an anti-NASH-derived HCC effect. AIM was incorporated into normal hepatocytes, in which AIM suppressed progress of fatty liver by interfering with accumulation of triglyceride. However, the states of inflammation or of fibrosis in response to a long-term high-fat diet were not altered in AIM-deficient mice as compared with wild-type mice. Thus, AIM appeared to eliminate the cancerized cells, rather than suppress a cancerization of hepatocytes. We also found that AIM eliminated the HCC by inducing cell death through activation of complement cascades which is prompted by the specific accumulation of AIM on the surface of the HCC.

研究分野：疾患生命科学

キーワード：NASH 脂肪肝 肝癌 AIM 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームとは、近年の生活環境の変化に伴い急速に表面化した現代病であり、肥満、糖尿病、動脈硬化など一連の疾患がドミノ倒しの様に発症する様相をいう。肝臓では、脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) を経て、肝細胞癌へと進行する場合も多い。NASH では、アルコール非依存性に肝実質が広範に線維化する病態を示すが、その正確な発症機序は不明である。肥満のみで NASH 症状の全てを高率に発症する動物モデルが望まれるが、野生型マウスを肥満させただけでは NASH を発症せず、メチオニン・コリン欠損餌や四塩化炭素投与など、非生理的な負荷を必要とするもの以外、理想的なモデル動物が存在しなかったことも、研究が困難である理由の一つといえる。

肥満はメタボリックシンドロームの基盤となる病態であり、肝臓においても同じく、そこから派生してインスリン抵抗性や脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、NASH、そして非ウイルス性の肝癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) の発症が導かれると考えられている。我々はこれまで、マクロファージが分泌する血中タンパク質 AIM (Apoptosis Inhibitor of Macrophage) が肥満抑制において重要な役割を果たすことを見出してきた。すなわち AIM は CD36 等のスカベンジャー受容体を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞へ取り込まれ、細胞内で脂肪酸合成酵素 (FAS: fatty acid synthase) の活性を阻害することで、結果的に中性脂肪の分解を促進し、抗肥満効果を示すことを明らかにしてきた。したがって高脂肪食を負荷した際、AIM 欠損マウスは野生型マウスと比較して顕著に脂肪が蓄積し、肥満が亢進する。また、その研究の過程で、高脂肪食を長期間負荷した AIM 欠損マウスには、野生型と比較して急激に脂肪肝が進行し、100% の確率で肝癌を発症することを見出した (当時論文未投稿データ)。通常、野生型マウスでは長期間高脂肪食を負荷すると肝臓の炎症やインスリン抵抗性は亢進する一方で脂肪肝以上の進展はなく、肝癌は発生しない。従って、高脂肪食を負荷した AIM 欠損マウスは、肥満の誘導により (1) 脂肪肝、(2) 線維化、および (3) 肝癌の発生というヒト NASH に近似した病態を個体差なく発症する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

以上の我々の予備的知見をもとに、NASH の理想的なモデル動物と言える高脂肪食負荷 AIM 欠損マウスの解析により、肥満から、脂肪肝、線維化 (肝硬変)、肝癌に進行する病態メカニズムの解明、またこの病態進行のどの部分に AIM が強く関与しているかを解析することを目的とした。将来的にはヒト患者において、AIM による治療法の開発を目

指すし、その成果は、今後の急速に増加するであろう NASH に対する極めて有望な医療戦略につながると考えられる。

3. 研究の方法

(1) NASH 肝癌の病態メカニズムにおける AIM の関連の解析

A. 脂肪肝亢進のメカニズム解析: AIM 欠損マウスは高脂肪食を負荷しても野生型マウスのような炎症やインスリン抵抗性の亢進は見られない一方で、中性脂肪の蓄積量が大きく、脂肪肝が亢進する。そこで、① AIM はいかにして肝細胞への脂肪蓄積を抑制するのか、② 脂肪肝亢進による脂質プロファイルの変化はないかを明らかにし、線維化につながる原因となる因子を探索する。

B. 脂肪肝から線維化に至るメカニズム解析: 高脂肪食を負荷した AIM 欠損マウスは脂肪肝亢進のち線維化を経て肝癌に至ると考えられる。線維化には肝細胞における① 細胞ストレスの増加、② 細胞死の増加、③ 炎症、が重要であると考えられているため、AIM 欠損マウスにおいてそれらの状態が亢進しているかどうか検証する。

C. 線維化から肝癌発生に至るメカニズム解析: 高脂肪食を負荷した AIM 欠損マウスは 40 週間以上の長期投与を続けると 100% の確率で肝癌が発生する。一方野生型で肝癌を発症するものはない。すなわち、脂肪肝 (肥満) が原因で発生する癌については AIM が癌化を防ぐ何らかの役割を担っていることは明らかである。そこでまず① 癌発生源 (肝細胞由来か、幹細胞由来か) を特定し、それに対し、② AIM はどのようにして癌を抑制するのかを解析する。

4. 研究成果

(1) AIM による脂肪肝由来肝癌抑制作用の解明—AIM による癌細胞除去機構

まず、AIM 欠損マウスおよび野生型マウスに高脂肪食を約 1 年間負荷すると、AIM 欠損マウスにおいて 100% の確率で肝癌を発症することが確かめられた。一方で、野生型マウスでは脂肪肝の亢進はみられるものの、肝癌の形成はみられなかった。そこで、脂肪肝から NASH を経て発症する肝癌において AIM は何らかの癌抑制作用を有することが考えられ、AIM による肝癌抑制のメカニズムの解析を行った。まず、AIM が細胞の癌化を抑制すかどうか、検討を行った。脂肪肝に起因する肝癌発症のプロセスとしては以下のような病態進行が考えられる。すなわち、脂肪肝の亢進とそれによる細胞ストレスの増加⇒細胞死⇒炎症⇒線維化⇒癌というステップである。この癌化の背景となるいずれかのステップにおいて AIM の有無により違いが生じないかどうか、高脂肪食を負荷したマウスの組織を用いて詳細な解析を行った。しかしながら、AIM 欠損マウスにおいては、その脂肪分解効果が欠損していることから脂肪肝

が野生型と比較して顕著に亢進していることに加え、細胞ストレスが増加している傾向がみられたが、その後のイベントである炎症や線維化といった癌化の背景となるプロセスにおいては AIM 欠損マウスと野生型マウスの間に有意な差はみられなかった。したがって、AIM は細胞の癌化を抑制しているのではなく、高脂肪食のストレスにより癌化した細胞の除去を促進しているのではないかと考えた。

そこで次に、AIM が HCC 細胞にどのように作用するか解析したところ、正常の肝細胞では AIM は細胞内に取り込まれるにもかかわらず HCC 細胞においては細胞内にとりこまれず細胞表面に蓄積することを見出した。実際に肝臓に HCC を保有する AIM 欠損マウスに AIM タンパク質を投与すると、AIM は HCC の細胞表面に集積することが確かめられた。

さらに、AIM が細胞表面に蓄積することが癌細胞にどのような影響を与えるか調べるために、ドキシサイクリン投与により適時に人為的に細胞膜結合型 AIM を発現する HCC 細胞安定発現株を作製し、AIM 欠損マウスの肝臓に移植した。この HCC 細胞株を移植したマウスにドキシサイクリンを投与し、AIM の細胞膜表面における発現を誘導すると、移植された HCC 細胞は数時間後には細胞死が誘導され、24~48 時間後には死滅し、かつマクロファージ等の食食細胞により除去されることが明らかになった。

これらのことから、AIM は癌細胞の細胞表面に蓄積することにより細胞死を誘導することを我々は見出した。AIM が細胞表面に蓄積してから細胞死が誘導されるまでの時間が数時間と短いため、免疫反応の誘導などではない即座の反応であると考えられることから、AIM は補体系を介して癌細胞に細胞死を誘導している可能性が示唆された。

以上をまとめ、図に示した。すなわち、AIM は正常な肝細胞（上段）においては細胞内に取り込まれ、細胞内では脂肪酸合成酵素の活性を抑制することで、中性脂肪の分解を促し脂肪肝を抑制するが、癌細胞（下段）では（HCC に限らず一般的にエンドサイトーシス能が低下しているため）、AIM が細胞内に取り込まれずに細胞表面に蓄積する。細胞表面に蓄積した AIM は、補体抑制因子のはたらきを阻害することにより補体カスケードの活性化を誘導し癌細胞を壊死させ、さらにマクロファージがそれを食食して除去することが明らかになった（論文⑤）。

この AIM による癌細胞除去機構は、脂肪肝由来肝癌だけでなくジエチルニトロソアミン（DEN）投与により形成された HCC においても有効であり、AIM が NASH 肝癌をはじめとした幅広い肝癌の予防・治療に応用できる可能性が示された。

(2) ヒトにおける AIM の血中濃度測定

上記のように、癌化を誘導する背景が存在する場合には AIM の有無が癌の進行を左右することから、ヒトにおける血中 AIM 値の解析をおこなった（論文④）。

まず健常者の血中 AIM 値として、約 8000 人の 10 代から 90 代の日本の健常人を対象に、血清を用いて血中 AIM 濃度をサンドイッチ ELISA 法にて解析したところ、AIM 値の平均値は男性で $4.99 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ 、女性で $6.06 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ であった（表）。興味深いことに女性の方が有意に AIM 値が高く、さらに加齢とともにその濃度は有意に低下する傾向がみられた。AIM は IgM 五量体と結合する

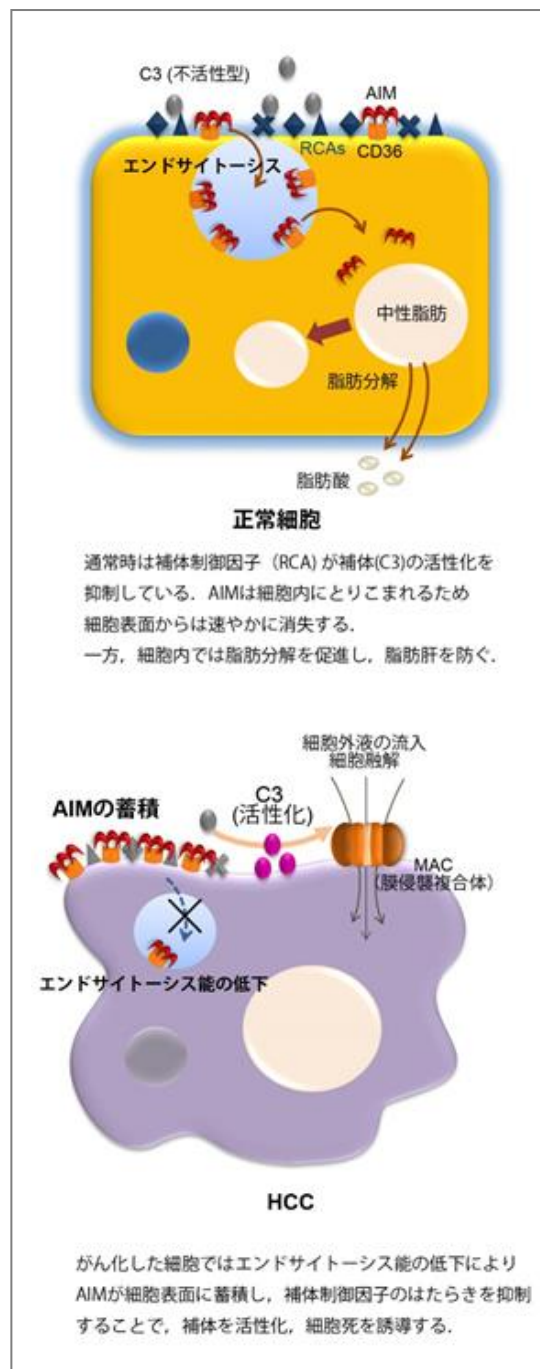


図 AIM による HCC 細胞特異的な細胞死誘導

ことで安定化することから、AIM 値と IgM 値は高い正の相関があり、加齢による AIM 値の低下も IgM 値の低下に伴うものであった。

年齢	男性		女性	
	AIM ($\mu\text{g/ml}$)	人数	AIM ($\mu\text{g/ml}$)	人数
10代	5.62 \pm 1.66	28	6.39 \pm 1.65	15
20代	5.41 \pm 1.67	368	6.75 \pm 2.05	592
30代	5.04 \pm 1.69	806	6.53 \pm 2.03	791
40代	4.90 \pm 1.76	1153	6.14 \pm 2.09	1163
50代	4.84 \pm 1.78	988	5.64 \pm 1.95	977
60代	5.02 \pm 1.80	580	5.45 \pm 2.1	579
70代	5.11 \pm 1.79	120	4.91 \pm 1.57	87
80代	4.69 \pm 1.57	9	5.57 \pm 2.84	16
90代	7.55 \pm 3.60	3	4.22 \pm 2.03	5
全体	4.99 \pm 1.76	4055	6.06 \pm 2.09	4225

表 健康人の血中 AIM 値 (血清濃度) 平均値 \pm SD ($\mu\text{g/ml}$) (論文④)

さらに、ヒト肝疾患と血中 AIM 値の関連においては興味深い研究結果が得られた。421人の肝疾患患者 (HCC患者を65%含む) を対象に、各種肝機能マーカーおよび AIM 値を測定したところ、HCCの有無にかかわらず、肝機能マーカー (総・直接ビリルビン値、血小板、アルブミン値、プロトロンビン時間、インドシアニン・グリーン [ICG] 試験) の悪化、すなわち肝障害の進行に伴い AIM 値が上昇する傾向がみられた。また AST、ALT においては健康人においても正の相関がみられた。今後はさらに NAFLD、NASH 患者を中心に、継時的に肝機能マーカーの推移と HCC の発症の有無、および AIM 値の変動を追った解析を行うことで、特に生活習慣病に密接した HCC 発癌リスクと AIM 値の関連性を見出すことが出来る可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Arai S, Kitada K, Yamazaki T, Takai R, Zhang X, Tsugawa Y, Sugisawa R, Matsumoto A, Mori M, Yoshihara Y, Doi K, Maehara N, Kusunoki S, Takahata A, Noiri E, Suzuki Y, Yahagi N, Nishiyama A, Gunaratnam L, Takano T, Miyazaki T. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute

kidney injury in mice. *Nat Med* 22:183-193, 2016, 査読有, doi: 10.1038/nm.4012.

- ② Miyazaki T, Arai S. A defense system against multiple diseases via biological garbage clearance mediated by soluble scavenger proteins. *Inflamm Regen.* 35:203-209, 2015, 査読有, doi.org/10.2492/inflammregen.35.203
- ③ Miyazaki T, Arai S. A defense system against multiple diseases via biological garbage clearance mediated by soluble scavenger proteins. *Inflamm Regen.* 35:203-209, 2015, 査読有, doi.org/10.2492/inflammregen.35.203
- ④ Yamazaki T, Mori M, Arai S, Tateishi R, Abe M, Ban M, Nishijima A, Maeda M, Asano T, Kai T, Izumino K, Takahashi J, Aoyama K, Harada S, Takebayashi T, Gunji T, Ohnishi S, Seto S, Yoshida Y, Hiasa Y, Koike K, Yamamura K, Inoue K, Miyazaki T. Circulating AIM as an Indicator of Liver Damage and Hepatocellular Carcinoma in Humans. *PLoS One* 9:e109123, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0109123
- ⑤ Maehara N, Arai S, Mori M, Iwamura Y, Kurokawa J, Kai K, Kusunoki S, Taniguchi K, Ikeda K, Ohara O, Yamamura K, Miyazaki T. Circulating AIM prevents obesity-associated hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Rep.* 9:61-74, 2014, 査読有, doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.058
- ⑥ Arai S, Miyazaki T. Impacts of the apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) on obesity-associated inflammatory diseases. *Semin Immunopathol.* 36:3-12, 2014, 査読有, doi: 10.1007/s00281-013-0405-5
- ⑦ Kai T, Arai S, Yamazaki T, Miyazaki T. Stabilization and augmentation of circulating AIM in mice by synthesized IgM-Fc. *PLoS One* 9:e97037, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0097037

[学会発表] (計 44 件)

- ① Miyazaki T. Urinary AIM ameliorates acute kidney injury via promoting intraluminal debris clearance. Max-Planck 国際シンポジウム, 2015.10.28, 東京大学, 東京
- ② Miyazaki T. A defense system against multiple diseases via biological garbage clearance mediated by apoptosis inhibitor of macrophage

- (AIM). ISCA Japan Programme, 2015. 9. 8, Ireland.
- ③ 前原奈都美, 肝病態を反映する新たなバイオマーカーの探索 血中 AIM の肝細胞がんリスクマーカーとしての有用性. 第 51 回日本肝臓学会, 2015. 5. 21, 熊本
- ④ 宮崎徹, 肝発癌研究と臨床への展開 血中タンパク質 AIM による肝癌細胞除去機構と新規治療法としての可能性. 第 51 回日本肝臓学会, 2015. 5. 21, 熊本
- ⑤ Miyazaki T. Prevention of hepatocellular carcinoma by circulating AIM through complement activation. Cell Symposium: Hallmark of Cancer, 2014. 11. 10, Beijing, China.
- ⑥ 新井郷子, Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014. 12. 11, 京都
- ⑦ 新井郷子, マクロファージ由来タンパク質 AIM による生体の新規恒常性維持機構, 第 7 回食品免疫学会次世代シンポジウム, 2014. 6. 30, 東京
- ⑧ Miyazaki T. A novel scavenging system for biological garbage promoted by circulating AIM protein and its therapeutic application. Max-Planck International Symposium, 2014. 12. 17, Berlin, Germany.
- ⑨ Miyazaki T. A novel scavenging system for biological garbage promoted by circulating AIM protein and its therapeutic application. The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2014. 6. 2, Kobe.
- ⑩ Miyazaki T. AIM as a key in the pathogenesis for obesity-associated modern diseases, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4. 17, Kyoto.
- ⑪ Miyazaki T., Roles for the apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in the prevention of fatty liver-associated hepatocellular carcinoma. 5th Colloquium Functional Genomics of the Liver, 2014. 3. 19, Paris, France.
- ⑫ 宮崎徹, 血中 AIM による生体内異物の新規除去機構とその臨床応用の可能性, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014. 7. 10, 東京
- ⑬ Arai S., Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain IgM immune complex on follicular dendritic cells. The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium, 2013. 12. 11, Pohang, Korea.
- ⑭ Miyazaki, T., Novel Therapy for the Metabolic Complications of Obesity, 9th Joint Meeting of Pediatric

Endocrinology, 2013. 9. 20, Milan, Italy.

- ⑮ Arai S., Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain IgM immune complex on follicular dendritic cells. Cell Symposium: Immunometabolism: 2013. 6. 10, Toronto, Canada.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 肝疾患の予防または治療剤

発明者: 宮崎徹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PTC/JP2013/062469

出願年月日: 2013. 4. 23

国内外の別: 国内・国外

名称: 肝疾患の予防または治療剤

発明者: 宮崎徹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PTC/JP2015/053415

出願年月日: 2015. 02. 06

国内外の別: 国内・国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: ・医薬組成物、飲食物およびこれらに関する方法

発明者: 宮崎徹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 5688659 号

取得年月日: 2015. 02. 06

国内外の別: 国内・国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 徹 (MIYAZAKI, Toru)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30396270

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

新井 郷子 (ARAI, Satoko)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 60422276